第10卷 增刊
1989年12月
动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH
Vol. 10, Sup.
Dec., 1989

# 乳酸脱氢酶LDH同功酶在猕猴属四种动物正常血清中的含量比较

王桂兰 唐承奎 许金菊

（中国科学院昆明动物研究所
中国实验动物云南灵长类中心 灵长类学联合实验室）

**摘 要**

用聚丙烯酰胺凝胶电泳PAGE和瑞典LKB-2202型激光光密度扫描仪，分析测定了猕猴属中恒河猴（*Macaca mulatta*），红面猴（*M. arctiodes*），熊猴（*M. assamensis*）和平顶猴（*M. nemestrina*）等四个种正常血清乳酸脱氢酶（LDH）同功酶谱型及含量变化。结果表明：这四个种正常血清的LDH同功酶及A、B两种亚基的含量存在着差异。其中恒河猴与平顶猴之间的差异相对较大，熊猴与红面猴之间的差异相对较小。本文讨论了这些差异与这四种猴的分类地位的关系。

**关键词**：猕猴属，乳酸脱氢酶，同功酶

乳酸脱氢酶同功酶分析已应用于细胞代谢、组织分化、生长发育及遗传进化等领域（Chan, 1962; Dawson, 1964; Kaplan, 1965; Markert, 1966; Stambaugh, 1962)。一些研究表明：不论是低等哺乳类，还是高等非人灵长类乃至人类，活体内的乳酸脱氢酶都是由两个等位基因调控编码的A、B两种亚基纯合或杂合形成的五种四聚体分子形式（Markert, 1966; Goodman, 1969; Wierre, 1959)。但是，在漫长的进化过程中，灵长类动物的乳酸脱氢酶存在着多态性（Shotaka, 1974）。灵长类大脑乳酸脱氢酶的A、B两种亚基的含量变化与系统演化有关（Syner, 1966; Goodman, 1969)。国内目前尚未见有关报道。本文对猕猴属四个种正常血清中乳酸脱氢酶同功酶各组份的活性含量及A、B两种亚基的含量变化规律进行了比较研究，从生物化学方面讨论了他们与分类进化的关系。

## 材 料 和 方 法

**一、材料：**

成年健康恒河猴（*Macaca mulatta*）15只（6♀，9♂），红面猴（*M. arctiodes*）

本文1989年7月17日收到，同年11月1日修回。

2只（1♀，1♂），平顶猴（*M. nemestrina*）8只（3♀，5♂）和熊猴（*M. assamensis*）2只（2♂）。均由昆明动物研究所饲养场提供。

自动物后肢静脉取血（2 ml/只），3000rpm离心20分钟，分离血清，置冰箱（−30°C以下）贮存备用。

**二、同功酶电泳分离**

采用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳（PAGE），凝胶浓度：C = 4%，T = 5.5%。胶管规格：5 $mm^2$ × 9 cm。每管加样10μl，电极缓冲系统为0.05*M* Tris—甘氨酸缓冲系统（pH = 8.3）；电流2.3～2.5mA/管。4℃电泳3小时。

**三、同功酶显色**

染液配方参照Markert（1966）和Brewer（1977）的方法，稍加改进。将电泳后的凝胶置于染色液中，37℃保温20分钟，待条带显出后用蒸馏水漂洗，置7%醋酸溶液中固定保存。

**四、同功酶的扫描定量及数据处理**

染色后的凝胶用瑞典LKB-2202型激光光密度扫描仪扫描，测定LDH同功酶各活性组份的百分含量。

各组份的相对迁移率按：

$$Rf = \frac{\text{样品迁移的距离}}{\text{示踪染料迁移的距离}}$$

进行计算。

用Nei（1975）的方法计算LDH同功酶各活性组份的百分含量在这四个种之间的平均差异距离：

$$Djk = -\log\left[\sum_i q_{ij}\cdot q_{ik} \Big/ \left(\sum_i q_{ij}^2 \cdot \sum_i q_{ik}^2\right)^{½}\right]$$

$$\overline{Djk} = \frac{Djk}{N}$$

j·k——分别代表两个不同的种。

$D_{jk}$——种间各组份的差异距离。

$\overline{D_{jk}}$——种间五种组份的平均差异距离。

根据LDH同功酶各组份的百分含量及其所代表的四聚体典型模式：LDH-1（$B_4$），LDH-2（$B_3A_1$），LDH-3（$B_2A_2$），LDH-4（$B_1A_3$），LDH-5（$A_4$）。参照Goodman（1969）的方法，计算A、B两种亚基的百分含量。

B% = (LDH-1) + 3/4(LDH-2) + 1/2(LDH-3) + 1/4(LDH-4)。

A% = 1 − B%。

## 结　果

**一、LDH同功酶谱型**

恒河猴、熊猴、红面猴和平顶猴的正常血清LDH均含5种同功酶组份（图1，图

2）。由“+”到“-”分别记为LDH-1，LDH-2，LDH-3，LDH-4，和LDH-5。从图1和图2可看出：四个种的LDH-1、LDH-2和LDH-3组份的含量都较高，而LDH-5的含量均较低。

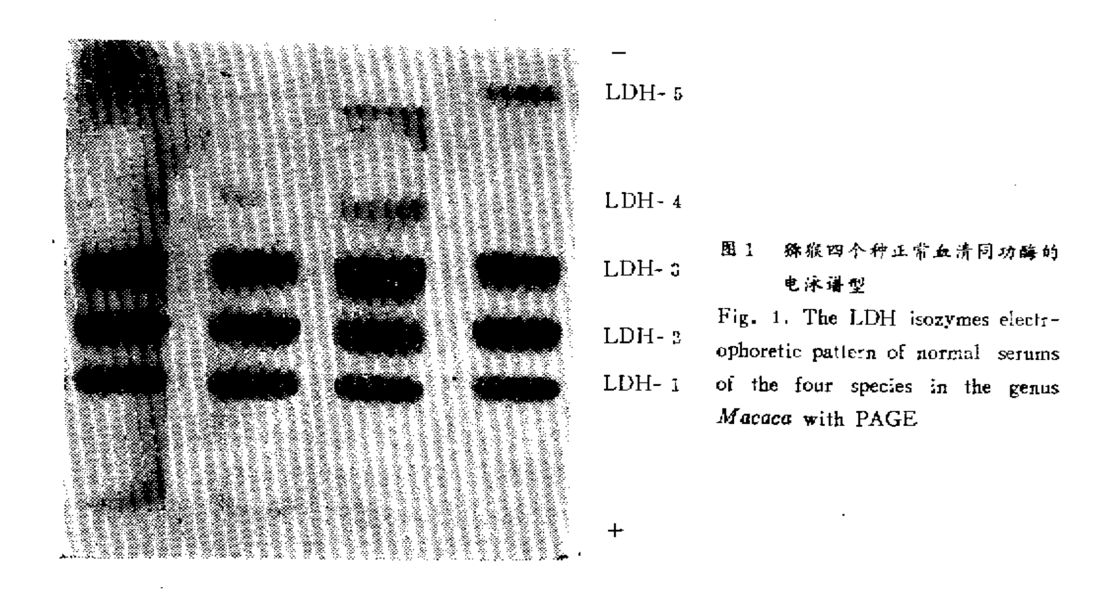



图1　猕猴四个种正常血清同功酶的电泳谱型

Fig. 1. The LDH isozymes electrophoretic pattern of normal serums of the four species in the genus *Macaca* with PAGE

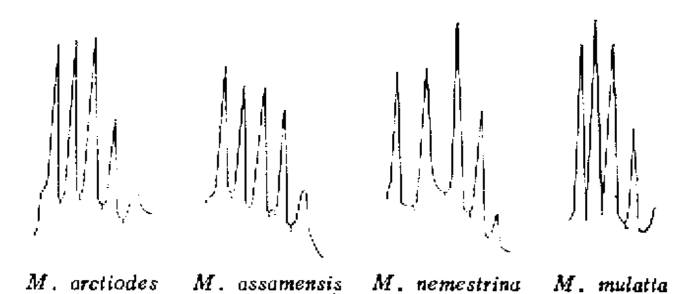



图2　猕猴属四个种正常血清同功酶电泳扫描图

Fig. 2. Densitometric scanning patterns of LDH isozymes of normal serums of the four species in genus *Macaca* with PAGE

各组份的电泳迁移率如表1所示。可见四种LDH各对应组份的迁移率在种间差异较小。

**表1　猕猴属四个种正常血清LDH同功酶PAGE电泳的相对迁移率**

**Table 1. The move ratio of the LDH isozymes of normes of the four species in the genus *Macaca* with PAGE**

| 种 | 迁 移 率 (move ratio) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | LDH-1 | LDH-2 | LDH-3 | LDH-4 | LDH-5 |
| 猕　猴 | 0.71±0.01 | 0.62±0.01 | 0.45±0.02 | 0.33±0.02 | 0.12±0.03 |
| 熊　猴 | 0.71±0.01 | 0.61±0.02 | 0.42±0.01 | 0.31±0.02 | 0.13±0.01 |
| 红面猴 | 0.69±0.03 | 0.60±0.02 | 0.43±0.02 | 0.31±0.02 | 0.12±0.03 |
| 平顶猴 | 0.72±0.02 | 0.63±0.02 | 0.45±0.02 | 0.33±0.01 | 0.14±0.03 |

### 二、LDH各组份的活性含量及分布顺序

四个种正常血清LDH各组份的活性含量和分布顺序如表2所示。由表2可看出：在LDH同功酶的五种组份中，这四个种的LDH-1，LDH-2和LDH-3的百分含量之和却占了总活性的80%左右，而LDH-4和LDH-5之和仅占总活性的20%左右，其中LDH-5的活性较低，仅占总活性的2.5%左右。

四个种的正常血清LDH的各组份活性分布顺序为：恒河猴：LDH-2＞LDH-1＞LDH-3＞LDH-4＞LDH-5；熊猴：LDH-3＞LDH-2＞LDH-1＞LDH-4＞LDH-5；红面猴：LDH-3＞LDH-2＞LDH-1＞LDH-4＞LDH-5；平顶猴：LDH-1＞LDH-2＞LDH-3＞LDH-4＞LDH-5。熊猴和红面猴具有相似的活性分布顺序，他们与恒河猴、平顶猴的活性分布顺序均不相同。恒河猴和平顶猴的活性分布顺序也不相同。

### 三、LDH活性含量的种间差异

四个种正常血清LDH同功酶五种组份活性含量的种间平均差异距离列于表3中。由表3可看出：恒河猴与平顶猴之间的差异相对较大（平均差异距离$\overline{Djk}=0.02074$）；恒河猴与熊猴、红面猴之间的平均差异距离分别为0.01784和0.01486；平顶猴与熊猴、红面猴之间的平均差异距离分别是0.01304和0.01191；熊猴与红面猴之间的差异相对较小，平均差异距离$\overline{Djk}=0.00551$。

### 四、LDH的A、B亚基的百分含量

四个种正常血清LDH的A、B两种亚基的百分含量列于表4中。由表4可看出：恒河猴的B亚基含量相对较高，为68.025%±5.143；红面猴和熊猴的B亚基含量分别为63.44%±5.034和62.928%±6.961；平顶猴的B亚基含量相对较低为61.159%±6.11。这四个种的A亚基百分含量的顺序为平顶猴＞熊猴＞红面猴＞恒河猴。而B亚基百分含量顺序则为恒河猴＞红面猴＞熊猴＞平顶猴。

表2　猕猴属四个种正常血清LDH同功酶各组份的活性含量及活性顺序

Table. 2. The active percentage (%) and sequence of the LDH isozymes in normal serum of the four species in the genus *Macaca*

| 种 | 动物数 n | LDH-1 | LDH-2 | LDH-3 | LDH-4 | LDH-5 | (sequence of isozyme activity) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 猕猴 | 15 | 27.38 ± 6.63 | 34.48 ± 4.73 | 22.41 ± 5.58 | 14.33 ± 5.84 | 2.14 ± 0.49 | LDH-2＞LDH-1＞LDH-3＞LDH-4＞LDH-5 |
| 熊猴 | 2 | 22.77 ± 6.26 | 28.64 ± 5.52 | 29.70 ± 4.36 | 15.32 ± 4.14 | 2.13 ± 0.88 | LDH-3＞LDH-2＞LDH-1＞LDH-4＞LDH-5 |
| 红面猴 | 2 | 27.54 ± 5.57 | 27.66 ± 5.27 | 27.70 ± 3.82 | 16.21 ± 2.37 | 2.48 ± 0.78 | LDH-3≥LDH-2≥LDH-1＞LDH-4＞LDH-5 |
| 平顶猴 | 8 | 28.24 ± 4.69 | 26.72 ± 5.28 | 25.62 ± 3.36 | 19.07 ± 4.64 | 2.24 ± 0.96 | LDH-1＞LDH-2＞LDH-3＞LDH-4＞LDH-5 |

**表3　猕猴属四个种正常血清LDH同功酶活性含量的种间平均差异距离**

**Table 3. The average difference distance ($\overline{Djk}$) of active contents of LDH between every pair of the four species in genus *Macaca***

| | 熊　猴 | 红面猴 | 平顶猴 |
|---|---|---|---|
| 恒河猴 | 0.01784 | 0.01486 | 0.02074 |
| 熊　猴 | | 0.00551 | 0.01304 |
| 红面猴 | | | 0.01191 |

**表4　猕猴属四种正常血清LDH的A、B两种亚基的百分含量（%）**

**Table 4. The percentage (%) of LDH-A and LDH-B in normal serums of the four species in the genus *Macaca***

| 种 | n | LDH-A (%) | LDH-B (%) |
|---|---|---|---|
| 猕　猴 | 15 | 31.975±5.956 | 68.025±5.143 |
| 熊　猴 | 2 | 37.075±6.961 | 62.928±6.961 |
| 红面猴 | 2 | 36.560±5.039 | 63.440±5.034 |
| 平顶猴 | 8 | 38.840±6.110 | 61.155±6.110 |

## 讨　论

同功酶分析法是遗传进化研究中的一项重要实验方法，遗传学上测得的每一种同功酶的亚单位型，乃是不同基因的产物（Rider，1980）。恒河猴、熊猴、红面猴和平顶猴，是猕猴属的四个种。对于猕猴属的分类进化关系，传统的表型进化（phenotype evolution）观点是以形态学，比较解剖学及动物地理学的资料为依据。Fooden（1976）根据雄性外生殖器的形态学特征，把猕猴属划分为四个种组（species group），10个种。恒河猴、红面猴、熊猴和平顶猴分别属于四个不同的种组。Delson（1980）根据骨骼的形态学及动物地理学资料，支持Fooden（1976）的观点，但不同的是他认为红面猴、熊猴的关系较为接近。随着分子生物学的发展，分子进化（molecular evolution）的观点为传统的表型进化观点提供了补充和参考。Nozawa等（1977）根据20多种血液蛋白质的多态变异数据构建的分子系统树，也与Fooden的基本观点相似。我们的实验结果表明，这四个种正常血清的LDH都呈现5条电泳谱带（图1，图2）；各对应组份的迁移率的种间差异较小（表1），LDH-5的活性含量较低，仅为2.5%左右（表2）。这提示了LDH各对应组份的分子大小和LDH-5的含量，在猕猴属内种间的进化关系上，可能存在一定的保守性（尚待进一步研究）。然而，LDH其他组份的活性含量及各组份的活性分布顺序，却存在着种间差异。从LDH五种组份的活性含量的平均差异看：恒河猴与平顶猴之间的差异相对较大（$\overline{Djk}=0.02074$），恒河猴与红面猴、熊猴之间也存在着差异（$\overline{Djk}$分别为00.01486和0.01784）；平顶猴与红面猴、熊猴之间的差异距离$\overline{Djk}$分别为0.01191和0.01304；熊猴与红面猴之间的差异相对较小（$\overline{Djk}=0.00551$）。从LDH各组份活性含量的分布顺序看：这四个种表现出四种活性分布顺序（表2），除熊猴与红面猴的分布顺序相似外，恒河猴与熊猴、红面猴、平顶猴以及平顶猴与红面猴、熊猴的活性分布顺序均不相同。练幼辉等（1987）用平板琼脂糖凝胶电泳分析了恒河猴正常血清LDH各组份的活性含量及分布顺序，我们的测试结果与其结果基本相似，仅是LDH-3和LDH-5这两个组份的含量值有些差异，这可能与测试条件有关。根据猕猴属这四个种正常血清LDH各组份的活性含量及其分布顺序的差异关系，如果把恒河

猴、熊猴、红面猴和平顶猴看作是LDH表型分化不同的四个类群，那么，红面猴和熊猴可能是LDH表型分化相近的两个类群，而恒河猴和平顶猴则可能是LDH表型分化相对较远的另外两个类群。这与Fooden（1976）和Delson（1980）的表型进化观点，以及Nozaawa（1977）根据蛋白质分子多态变异提出的猕猴属分类观点基本相似。

再一方面，LDH是细胞能量代谢的重要酶类之一。大量的研究表明：LDH的A、B两种亚基，在能量代谢中存在着某种特殊的功能（Chan，1962；Dawson，1964；Stambaugh，1962；Kaplan，1960）。LDH-B更适应于有氧代谢和持久的能量生产，而LDH-A则更适应于无氧代谢和偶尔的能量生产（Kaplan，1965）。Goodman（1969）和Syner（1966）研究了灵长类动物大脑LDH的A、B两种亚基的含量，其结果表明：随着灵长类系统演化阶梯的上升，成年动物大脑的LDH，存在着由A亚基含量优势向B亚基含量优势转化的趋势。说明LDH的B亚基含量是灵长类动物进化过程中，能量代谢水平进化的重要标志。从我们的实验结果看，在这四种猕猴属动物的血清中，LDH的A亚基含量约占30%～40%，B亚基含量约占60%～70%（表5）。表明他们的能量代谢水平都以需氧代谢为主。其中恒河猴的B亚基含量为68.025%±5.143；红面猴为63.440%±5.034；熊猴为62.928%±6.961；平顶猴为61.159%±6.110。由此可见，这四种猕猴属动物的需氧代谢水平以恒河猴相对较高，红面和熊猴居中，平顶猴相对较低。

综上所述，四种猕猴属动物的正常血清中，LDH的含量变化存在着一些差异。值得注意的是：他们之间的差异关系，与Nozawa（1977）构建的分子系统树相类似，与Fooden（1976）和Delson（1980）提出的表型进化观点也基本相符。这提示了从含量变化的角度比较分析代谢过程中起重要作用的同功酶，对于从分子水平研究灵长类动物的系统演化关系，具有十分重要的意义。

注：本文中同功酶的扫描测定工作由陆源、韩灯保等同志帮助进行。文章撰写过程中曾得到彭燕章、邹如金同志的热情指导。特此致谢。

## 参考文献

练幼辉等 1987 正常恒河猴血清LDH同功酶和异柠檬酸脱氢酶的分析。实验动物科学 4(1)：4—6。

Brewer, G. J. 1970 An introduction to isozymes techniques. Academic Press, London.

Delson, E., and Andre, P. 1980 Evolution and interrelationship of the Catarrhine Primates. In: W. P. luckett and F. Szalay (eds), Phylogeny of the primates. New York, Plenum press.

Fooden, J. 1976 Provisional classification and key to living species of macaque (orimates, *Macaca*). *Folia Primate*. 25:225—236.

Goodman, M., Frank, N. *et al*. 1969 Phylogenetic changes in the proportinary of two kinds of lactate dehydrogenases in primates brain regions. *Brain Res*. 14(2):447—459.

Kaplan, N. O. 1965 Evolution of dehydrogenases. In: V. Bryson and H. J. Vogel (Eds), Evolution genes and protein. Academic Press, New York. pp. 243—277.

Markert, C. L., and Moller, F. 1966 Multiple forms of enzymes: tissue, ont genetic, and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Wash.) 4:753—763.

Nei, M., 1975 "Molecular Population Genetics and Evolution." North-Holland Amsterdam and Oxford.

Nozawa, K. *et al*. 1977 Genetic variations and between species of Asian Macaques. *Jap. J. Genet*. 52:15—30.

Shotaka, T. 1974 Genetic polymorphism of blood proteins in the troops of Japanese *Macaca*. *Macaca fuscata*, Ⅰ: Erythrocyte lactate dehydrogenase polymorphism in *Macaca fuscdta*. *Primates* 15(14) 297—303.

Syner, F. N. and Goodman, M. 1966 Differences in the lactate dehydrogenases of primates brain. *Nature* (land.) 209: 426—428.

# COMPARATIVE STUDY ON CONTENTS OF LACTATE DEHYDROGENSE ISOZYMES FROM NORMAL SERUMS OF FOUR TAXA IN THE GENUS *MACACA*

Wang Guilan Tang Chengkui Xu Jinju
(*Joint Laboratory of Primatology, KIZ & YNLPC*)

The polyacrylamide gel electrophoresis patterns of lactate dehydrogenase isozymes of normal serums of the four species in genus *Macaca* were analysed quantitatively by LKB-bromma 2202 Ultroson Laser Densitometer. The results showed that there were some differences for active contents of LDH-A and LDH-B and LDH isozymes pattern between these species. The differences between *M. mulatta* and *M. nemestrina* were greater than that between *M. assamensis*. These differences were considered as the relationship with the phylogeny of these species.

**Key words:** *Macaca*, Lactate dehydrogense, Isozymes.

* Authors address: Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica.